การเพิ่มผลผลิตสีเหลืองของเชื้อรา *Monascus* sp. 20 M 10.2 ในอาหารแป้งมันสำปะหลัง

Improvement of Yellow Pigment Production by *Monascus* sp. 20 M 10.2 Grown in Cassava Medium

สมชาย ไกรรักษ์[1] บุษบา ยงสมิทธิ์[1] สาวิตรี อิ่มทอง[1] ปราโมทย์ ศิริโรจน์[1]
เลอลักษณ์ จิตรดอน[1] และ กล้าณรงค์ ศรีรอต[1]

Somchai Krairak, Busaba Yongsmith, Savitree Limtong, Pramote Sirirote, Lerluck Chitradon and Klanarong Srirot

ABSTRACT

A mutant, *Monascus* sp. 20 M 10.2 which is capable on producing on yellow pigments (λ_{max} 370 nm) in liquid cassava-soybean medium had been firstly reported by our group, wheareas their parents showed red pigmentation (λ_{max} 420 and 500 nm.) Problem and factors affecting yellow pigmentation such as wall-growth formation ; cultivation method etc. have been investigated to improve the pigmentation yields. It was found that simple medium containing 3% cassava starch, 5% soybean flour and 1.33×10^{-3} g/l of tween 80, at neutral pH gave better yellow pigments (674 U/ml) than other formula. Liqiud inoculun could reduce the time of the inoculum preparation and amount from 2 weeks and 3% (w/v) of koji inoculum to 2 days and 2% (v/v), respectively. Fed-batch cultivation could increase 45% of the yellow pigmentation over those from batch culture up to 959 U/ml. Using propeller blade and draft tube in fermentor could prevent wall-growth and thus the fungal cells were mixed sufficiently with the medium.

บทคัดย่อ

เชื้อรากลายพันธุ์ *Monascus* sp. 20 M 10.2 ได้ถูกค้นพบเป็นครั้งแรกว่ามีความสามารถสร้างสีเหลือง (λ_{max} 370 nm) ในอาหารเหลวแป้งมันสำปะหลัง-ถั่วเหลือง ได้เป็นอย่างดี ในขณะที่สายพันธุ์พ่อแม่สร้างสีแดงที่ λ_{max} 420 และ 500 nm ปัญหาและปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการสร้างสีเหลืองเช่น การเกิด wall growth การเกิด pallet ขนาดใหญ่ การเตรียมต้นเชื้อ ลักษณะการเลี้ยงเชื้อรา ฯลฯ ได้ถูกนำมาศึกษาเพื่อหาทางเพิ่มผลผลิต ซึ่งผลการทดลองต่าง ๆ ได้พบว่าสูตรอาหารที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 3% แป้งถั่วเหลือง 5% Tween 80 ปริมาณ 1.33×10^{-3} กรัมต่อลิตร พีเอชอาหารเริ่มต้นเป็นกลางเหมาะสมที่สุด ทำให้ได้ pellet ขนาดเล็ก เหมาะสมต่อการสร้างสีเหลือง และเอนไซม์กลูโคอะมิเลส สูตรอาหารดังกล่าวให้สีเหลือง (674 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ในเวลา 7 วัน สูงกว่าสูตรอื่น ๆ การใช้ต้นเชื้อแบบ liquid inoculum ช่วยลดเวลาการเตรียมต้นเชื้อเหลือ 2 วัน และปริมาณต้นเชื้อใช้เพียง 2.0% (v/v) ในขณะที่เดิมใช้ต้นเชื้อแบบโคจิ ang-kak ปริมาณถึง 3.0% (w/v) ซึ่งใช้เวลา

1 ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ
Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University.

2 ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ
Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University.

การเตรียมต้นเชื้อนานกว่า 2 สัปดาห์ การเลี้ยงเชื้อแบบ fed-batch ให้ผลดีกว่าแบบ batch โดยได้สีเหลืองเพิ่มขึ้นจากเดิมถึง 45% เป็น 959 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในเวลา 9 วัน การใช้ใบกวน propeller และ draft tube ช่วยลดการเกิด wall growth ทำให้เชื้อราโมแนสคัสคลุกเคล้ากับอาหารได้ดียิ่งขึ้น

คำนำ

สีจากธรรมชาตินับวันจะมีบทบาทมากขึ้นในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากมักพบอันตรายจากใช้การสีสังเคราะห์เพิ่มขึ้น (บุษบา, 2531 ; Huang, 1981 ; Su, 1978) สีจากธรรมชาติได้จากพืช สัตว์ และ จุลินทรีย์ และ *Monascus* sp. ก็เป็นเชื้อราที่ที่รู้จักกันดีว่าให้สีธรรมชาติ ซึ่งใช้มานานแล้วในประเทศจีน และแถบเอเชีย และยอมรับให้ใช้แทนสีสังเคราะห์ (Wong, 1982) สีที่ได้จากโมแนสคัสแบ่งออกเป็น 3 ประเภทคือ สีแดง สีส้ม และ สีเหลือง ขึ้นอยู่กับสภาพการเลี้ยงเชื้อ ถ้าเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีพีเอชเป็นกลางเชื้อสามารถเจริญได้ดีและ สร้างสีแดงเป็นหลัก ส่วนสีส้มและสีเหลืองจะเกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีพีเอชต่ำซึ่งการเจริญก็จะต่ำไปด้วย (Carels และ Shephred, 1977 ; Shepherd, 1977 ; Yongsmith และคณะ, 1992) ส่วนใหญ่การผลิตสีใช้วิธีเลี้ยงในอาหารที่พีเอชเป็นกลาง แล้วแยกสีต่างๆ โดยใช้กระบวนการทางเคมี (Sweeny และคณะ, 1981) การสร้างสีของเชื้อรา *Monascus* sp. เกิดได้ทั้งในสภาพการเจริญบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว ซึ่งข้อเสียของการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งได้แก่ การขยายกำลังการผลิตทำได้อย่างจำกัด และระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวผลผลิตนานโอกาสปนเปื้อนเป็นไปได้มาก สำหรับการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสในอาหารเหลวสามารถขยายการผลิตได้ง่ายเพราะควบคุมกระบวนการผลิตได้สะดวกกว่า และใช้เวลาในการเก็บเกี่ยวสั้นกว่า แต่ปัญหาที่เกิดก็คือมักพบการเจริญของเชื้อราที่ผนัง แกนกวน และฝาถังหมัก เรียกว่า wall growth เช่นเดียวกับเชื้อราชนิดอื่นๆ (Byrne และ Ward, 1989) นอกจากนี้ยังพบว่าลักษณะการเจริญของเชื้อราทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความหนืดของอาหารเหลว ซึ่งมีผลกระทบต่อการส่งผ่านมวลสาร (mass transfer) ในถังหมัก (Suijdam และ Metz, 1981) แม้ว่าในปัจจุบันได้มีการใช้วิธีการเลี้ยงเชื้อแบบป้อนอาหาร (fed-batch cultivation) เพื่อแก้ปัญหาและเพิ่มผลผลิต แต่ก็ยังคงพบปัญหาเหล่านี้อยู่ ในการทดลองครั้งนี้เพื่อศึกษาปัญหา และปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์ใหม่ที่ได้พบว่าสามารถสร้างสีเหลืองในอาหารเลี้ยงเชื้อพีเอชเริ่มต้นเป็นกลาง เช่น การใช้สูตรอาหาร และต้นเชื้อที่มีลักษณะและปริมาณที่เหมาะสม ลักษณะการเลี้ยงเชื้อแบบ batch และ fed-batch การเกิด pellet ของเชื้อรา ลักษณะของการไหลของของเหลวในถังหมัก เมื่อใช้ใบกวนลักษณะต่างๆ ร่วมกับ draft tube

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เชื้อจุลินทรีย์

1.1 เชื้อราสายพันธุ์พ่อแม่ *Monascus* sp. KB 11304 ได้รับจาก น.ส.วรรณภา ทาบโลกา (วรรณภา, 2529)

1.2 เชื้อรา *Monascus* sp. KB 10 M 16 กลายพันธุ์จาก *Monascus* sp. KB 11304 โดยการนำไปผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอุลตร้าไวโอเลต (UV) นาน 10 นาที ได้รับจาก น.ส.นิภา กระทุ่มเขตต์ นักวิจัยในโครงการวิจัยเรื่องการผลิตสีผสมอาหารจากแป้งมันสำปะหลัง

1.3 เชื้อรา *Monascus* sp. KB 20 M 10.2 เป็นเชื้อรากลายพันธุ์มาจากเชื้อรา *Monascus* sp. KB 10 M 16

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 อาหารเก็บรักษาเชื้อ MYS (malt yeast extract agar slant) (บุษบา และวรรณภา, 2527) (วรรณภา, 2529)

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการสร้างสีคือ optimized medium (บุษบา และวรรณภา, 2527) (วรรณภา, 2529)

3. การเตรียมต้นเชื้อสำหรับการเจริญและการสร้างสี

เขี่ยเชื้อจากหลอดเก็บรักษามาเลี้ยงในอาหารแข็ง MYS โดยวางตรงกลางจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 7-10 วัน แล้วใช้ที่เจาะจุกคอร์ก (cork borrow) ขนาด 4.0 มิลลิเมตร เจาะวุ้นบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อ ใช้ก้อนเชื้อดังกล่าว เป็นต้นเชื้อสำหรับทดลองการเจริญ และการสร้างสีในอาหารทดสอบต่างๆ ในฟลาสก์ ส่วนในถังหมักใช้ต้นเชื้อแบบหมักบนเมล็ดข้าว (ang-koji) ตามวิธีของสุภาพร (2531) เปรียบเทียบกับการเตรียมเชื้อเริ่มในอาหารเหลวในฟลาสก์

4. การวิเคราะห์

การวิเคราะห์สีตามวิธีของ Lin (1973)

การวิเคราะห์เอนไซม์กลูโคอะมิเลส ใช้วิธีของ Iizuka และ Mineki (1977)

การวิเคราะห์แป้งใช้วิธีของ Dubois (1956)

วิธีการ

ศึกษาค่าการดูดกลืนแสงของสีที่สร้างจากเชื้อรา *Monascus* sp. KB 20 M 10.2

ศึกษาการดูดกลืนแสงสูงสุด (maximum adsorption) ระหว่างสีที่สร้างจากเชื้อรา *Monascus* sp. KB 20M10.2 กับ KB 11304 และ KB 10M16 โดยนำน้ำสีของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ที่เจริญใน optimized medium ปริมาณ 1 มิลลิลิตร มาทำให้เจือจางด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาหาค่า maximum adsorption ด้วยเครื่อง Shimadzu-UV-Vis recording spectrophotometer UV-240

ศึกษาอิทธิพลของการขาดสารอาหารไนโตรเจนแต่ละชนิดในสูตรอาหาร MYS

เตรียมอาหารเหลว MYS เป็น complete medium (CM) ซึ่งปกติประกอบด้วยสารอาหารไนโตรเจนสำคัญอยู่ 3 ชนิดคือ ยีสต์เอกซ์แทรค เปปโตน และมอลท์เอกซ์แทรค โดยมีการดึงสารอาหารบางตัวออกดังนี้ คือ มอลท์เอกซ์แทรค (CM-m) ยีสต์เอกซ์แทรค (CM-y) เปปโตน (CM-p) แล้วปรับพีเอชอาหารเริ่มต้นตั้งแต่ 2.5 3.0 4.0 5.0 6.0 6.7 7.0 และ 8.0 โดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริค หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ บรรจุอาหารเหลว MYS ที่ขาดแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ จำนวน 75 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร วิเคราะห์ปริมาณสี กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอมิเลส และแป้งที่เหลือ

ศึกษาสภาพที่เหมาะสมต่อการสร้างสีในฟลาสก์

สภาพการเจริญของเชื้อราในอาหาร optimized medium ที่มีองค์ประกอบของปริมาณแป้งมันสำปะหลัง แป้งถั่วเหลือง ปริมาณ Tween 80 พีเอชอาหารเริ่มต้น ความเร็วรอบในการเขย่าฟลาสก์ อุณหภูมิในการเจริญ ปริมาณก้อนต้นเชื้อ ฯลฯ บนเครื่องเขย่าแบบหมุนวน New Brunswick รุ่น G10

การเตรียมต้นเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างสี

1. ต้นเชื้อจากข้าวแดง เลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. KB 20M10.2 ลงในข้าวแดงตามวิธีของสุภาพร (2531) โดยใช้ข้าวแดงที่ปริมาณต่างๆ เป็นต้นเชื้อสำหรับการสร้างสีในอาหาร optimized medium

2. ต้นเชื้อจากสปอร์ นำข้าวแดงจากข้อ 1 มาทำเป็นสารละลายสปอร์ โดยเติมสารละลาย Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ปลอดเชื้อ ปรับให้มีปริมาณสปอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ สำหรับเป็นต้นเชื้อในอาหาร optimized medium

3. ต้นเชื้อจากเชื้อราเจริญในอาหารเหลว โดยเลี้ยง *Monascus* sp. KB 20M10.2 เจริญในอาหาร optimized medium อายุต่างๆ นำมาใช้เป็นต้นเชื้อในลักษณะ

3.1 นำเชื้อที่ได้จากการเจริญที่อายุต่างๆ ปริมาณที่เหมาะสมปลูกลงในอาหาร optimized medium ศึกษาการสร้างสี

3.2 นำเชื้อที่ได้จากการเจริญที่อายุต่างๆ ไปผ่านเครื่องปั่น (Waring blender) ความเร็วสูงสุดนาน 2 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สารละลายที่ได้ใช้เป็นต้นเชื้อที่ปริมาณต่างๆ ปลูกเชื้อลงในอาหาร optimized medium ศึกษาการสร้างสี

3.3 นำเชื้อที่ได้จากการเจริญที่มีอายุต่างๆ ไปผ่านเครื่องเหวี่ยงความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำเซลล์ที่แยกได้ปริมาณต่างๆ ไปปลูกเชื้อลงในอาหาร optimized medium ศึกษาการสร้างสี

ศึกษาสภาพที่เหมาะสมต่อการสร้างสีโดยการเลี้ยงเชื้อแบบป้อนอาหาร (fed-batch)

การเลี้ยงเชื้อแบบป้อนอาหารนี้ศึกษาในฟลาสก์ความจุ 250 มิลลิลิตร บรรจุอาหาร optimized medium เริ่มต้นที่ปริมาตรต่างๆ แต่ควบคุมปริมาตรสุดท้ายของการเติมอาหารเป็น 75 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหารเริ่มต้นการเติมอาหารครั้งแรก และครั้งต่อๆ ไป แบ่งการศึกษาได้เป็นดังนี้คือ

เชื้อเจริญในอาหาร optimized medium เริ่มต้น 50 มิลลิลิตร เมื่อเชื้อราเจริญถึงอายุต่างๆ จึงเติมอาหาร optimized medium ลงไปอีก 25 มิลลิลิตร

เชื้อเจริญในอาหาร optimized medium เริ่มต้น 25 มิลลิลิตร เมื่อเชื้อราเจริญถึงอายุต่างๆ จึงเติมอาหาร optimized medium ลงไปอีก 2 ครั้งๆ ละ 25 มิลลิลิตร โดยเติมอาหารห่างกันหนึ่งวัน สองวัน และสามวันของการเจริญ

ศึกษาปัจจัยของใบกวนชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อลักษณะการไหลของของเหลวในถังหมักที่เหมาะสมต่อการสร้างสี

1. การไหลแบบ axial flow โดยใช้ใบกวน flate blade พร้อม draft tube propeller พร้อม draft tube และ propeller

2. การไหลแบบ radial flow โดยใช้ใบกวน flate blade

โดยเลี้ยงเชื้อรา Monascus sp. KB 20M10.2 ในถังหมักของ Marubishi รุ่น MD-75 ขนาด 5 ลิตร ในอาหาร optimized medium ปริมาตร 2,500 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อโดยใช้อัตราการกวนความเร็ว 300 รอบต่อนาที ใน 3 วันแรกของการเจริญ และปรับเป็น 500 รอบต่อนาทีในวันต่อมา อัตราการให้อากาศ 0.75 vvm ควบคุมอุณหภูมิระหว่างการหมักเป็น 28+2 องศาเซลเซียส

ผลการทดลองและวิจารณ์

เชื้อรา Monascus sp. KB 11304 (บุษบา และวรรณภา, 2527 ; วรรณภา, 2529) ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยแสง UV ได้เชื้อรา *Monascus* sp. 10M16 และเมื่อชักนำการกลายพันธุ์ในครั้งที่ 2 ด้วยแสง UV เป็นเวลา 20 นาที ได้เชื้อรากลายพันธุ์จำนวน 158 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้พบว่ามี 7 สายพันธุ์สามารถสร้างสีเหลืองในอาหาร optimized medium ที่มีพีเอชอาหารเป็นกลาง (Yongsmith และคณะ, 1990) พบว่าเชื้อรา *Monascus* sp. 20M10.2 สร้างสีเหลืองได้มากที่สุดเท่ากับ 411 หน่วยต่อมิลลิลิตร (max 370 mm) สีที่ได้จากเชื้อรา *Monascus* sp. KB 11304 10M16 และ 20M10.2 นำมาศึกษาการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ ดังแสดงในภาพที่ 1 พบว่าสีแดงจากเชื้อรา *Monascus* sp. KB 11304 ให้การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 และ 500 นาโนเมตร สีแดงจากสายพันธุ์ 10M16 ให้การดูดกลืนแสงที่ 370 420 และ 500 นาโนเมตร ส่วนสายพันธุ์ 20M10.2 ให้การดูดกลืนแสงที่ 370 นาโนเมตร เท่านั้น แสดงว่าการกลายพันธุ์ดังกล่าวเป็นไปอย่างต่อเนื่อง และเมื่อนำสีเหลืองของสายพันธุ์ 20M10.2 มาศึกษาโครงสร้างพบว่าเป็นสาร monascin เป็นส่วนใหญ่ (ดังแสดงในภาพที่ 2)

การใช้คาร์บอนชนิดต่างๆ ของสายพันธุ์ 20M10.2 พบว่าเจริญได้ดีในแหล่งคาร์บอนหลายชนิด โดยให้สีดีที่สุดเมื่อใช้ แป้งข้าวเหนียว น้ำตาลไรโบส soluble starch แป้งข้าวจ้าว แป้งมันสำปะหลัง เท่ากับ 576 570 552 541 536 และ 500 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อบ่มครบ 7 วัน ตามลำดับ ส่วนการสร้างสีในแลคโตส กาแลคโตส ซูโครส ราฟฟิโนส และแลคเตท ให้ผลการสร้างสีน้อย ดังแสดงในภาพที่ 3 จากการทดลองจึงเลือกใช้แป้งมันสำปะหลัง ส่วนการใช้แหล่งไนโตรเจนในอาหาร MYS พบว่าเปปโตนมีผลต่อการสร้างสี ยีสต์เอกซ์แทรคมีผลต่อการเจริญ ส่วนมอลเอกซ์แทรคเป็นตัวเสริมการสร้างสี และการเจริญ (ดังแสดงในภาพที่ 4) เช่นเดียวกับการทดลองของวรรณภา (2529) บุษบา (2531), McHan และ Johnson (1970), Shepherd (1977), Carels และ Shepherd (1978), Shepherd และ Carels (1983)

เมื่อปรับปรุงสูตรอาหาร optimized medium ต่อการสร้างสีของสายพันธุ์ 20M10.2 พบว่าอาหารประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 3.0 เปอร์เซ็นต์ แป้งถั่วเหลือง 5.0 เปอร์เซ็นต์ และ Tween 80 ปริมาณ 1.33×10^{-3} กรัมต่อลิตร ที่พีเอชอาหารเริ่มต้น 7.0 ปริมาตรอาหาร 75 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงเชื้อที่ความเร็วการเขย่า 300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ให้การสร้างสีสูงสุด 674 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 5 จากการทดลองพบว่าการสร้างสีเหลืองที่พีเอชอาหารเริ่มต้น 7.0 ต่างไปจากการทดลองของวรรณภา (2529) Carels และ Shepherd (1978) Shepherd (1977) และ Yongsmith และคณะ (1992) ที่พบการสร้างสีเหลืองที่พีเอชเป็นกรดเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่าการเจริญในอาหารพีเอชเริ่มต้นต่ำประมาณ 2.5-5 ให้การเจริญเป็น pellet รูปร่างทรงกลม (sphearical form) มากกว่ารูปแท่ง (neddle form) ทำให้การสร้างสีน้อย แต่เมื่อใช้พีเอชอาหารเริ่มต้นประมาณ 6-7 ให้การเจริญเป็น pellet รูปแท่งมากกว่า จึงได้สีมากกว่า อาจเป็นเพราะการเจริญเป็น pellet รูปแท่งให้ผลการส่งผ่านมวลสารได้ดีกว่าการเจริญเป็นรูปร่างทรงกลม

การศึกษาเพื่อใช้ต้นเชื้อสภาพต่างๆ เช่นโคจิอั๊งกัก โคจิสปอร์ และ liquid inoculum ต่อสะดวก การพัฒนานำไปใช้ขยายกำลังการผลิต พบว่าการใช้ต้นเชื้อจากโคจิอั๊งกักปริมาณ 3 เปอร์-เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ปริมาณสีเพียง 431 หน่วยต่อมิลลิลิตร (แสดงในภาพที่ 6) พบ

การเจริญเป็น pellet ขนาดใหญ่ภายใน pellet เป็นเมล็ดข้าว ขณะที่การใช้ต้นเชื้อเป็นสปอร์ให้ปริมาณสีถึง 498 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งได้ปริมาณพอๆ กับการใช้ต้นเชื้อจากเชื้อราเจริญในอาหารเหลวที่นำมาใช้เลย หรือผ่านการเหวี่ยงนำเซลล์มาใช้ดังแสดงในภาพที่ 7 8 และ 9 โดยพบการเจริญเมื่อใช้ต้นเชื้อจากสปอร์เป็น pellet ทรงกลม ขนาดเล็กประมาณ 0.1-0.3 มิลลิลิตร ส่วนการเจริญเมื่อใช้ต้นเชื้อจากเชื้อเจริญในอาหารเหลวให้การสร้าง pellet ทรงกลม ขนาด 0.3-0.5 มิลลิลิตร ซึ่งให้สีใกล้เคียงกัน แต่เมื่อใช้ต้นเชื้อจากเชื้อเจริญในอาหารเหลว แล้วผ่านการปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันกลับให้ปริมาณสีสูงสุดถึง 530 หน่วยต่อมิลลิลิตร (ดังแสดงในภาพ 10) ซึ่งพบการเจริญมีลักษณะเป็น thread like ทำให้อาหารภายในฟลาสก์มีลักษณะค่อนข้างหนืด แต่ก็ไม่มีผลต่อการส่งผ่านมวลสาร แต่ถ้านำไปใช้เป็นต้นเชื้อในถังหมักทำให้ความหนืดของอาหารเพิ่มขึ้น และการสร้างสีลดลง ดังนั้นจึงเลือกใช้ต้นเชื้อจากเชื้อเจริญในอาหารเหลวสำหรับการทดลองในถังหมักต่อไป

การเลี้ยงเชื้อแบบป้อนอาหารของเชื้อรา *Monascus* sp. 20M10.2 พบว่าเมื่อใช้ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 2/3 ของปริมาตรทั้งหมด เมื่อให้การเจริญมีอายุ 2 วัน จึงป้อนอาหารที่เหลืออีก 1/3 พบว่าการสร้างสียืดยาวออกไป โดยได้สีสูงสุดในวันที่ 9 เท่ากับ 959 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 11 เมื่อเทียบกับการเจริญแบบเบ็ดเสร็จที่ใช้ปริมาณสีสูงสุดในวันที่ 7 เท่ากับ 663 หน่วยต่อมิลลิลิตร พบว่าปริมาณสีของการเลี้ยงเชื้อแบบป้อนอาหารเพิ่มขึ้น 45 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ใช้เวลาการเลี้ยงเพิ่มขึ้นเพียง 2 วัน ส่วนการเลี้ยงเชื้อแบบป้อนอาหารที่ใช้ปริมาณเริ่มต้น 1/3 เมื่อเชื้อเจริญได้อายุต่างๆ จึงเติมอาหารลงไปอีก 2 ครั้งๆ ละ 1/3 พบว่าปริมาณสีได้มากกว่าการเลี้ยงเชื้อแบบเบ็ดเสร็จ แต่ไม่มากเท่ากับการเลี้ยงเชื้อแบบป้อนอาหารที่ปริมาตรเริ่มต้นเป็น 2/3 เป็นเพราะการเจริญแบบป้อนอาหารช่วยลดอิทธิพลของ substrate inhibition อีกทั้งพบว่าการเจริญแบบป้อนอาหารให้การเจริญของเชื้อราเป็น pellet รูปแท่งมากกว่าการเจริญแบบเบ็ดเสร็จ

เมื่อศึกษาผลของใบกวนต่อการสร้างสีในถังหมักขนาด 5 ลิตร ใช้อาหาร optimized medium ปริมาตร 2,500 มิลลิลิตร ในสภาพการกวนภายใน 3 วันแรกเป็น 300 รอบต่อนาที หลังจากนั้นจึงเพิ่มการกวนเป็น 500 รอบต่อนาที (บุษบา, 2531) พบว่าการใช้ใบกวนแบบ propeller ร่วมกับ draft tube ให้การสร้างสีดีที่สุด รองลงมาคือการใช้ใบกวน flat blade ร่วมกับ draft tube ส่วนการใช้ใบกวน propeller อย่างเดียวให้ผลการสร้างสีน้อย โดยพบว่าการเจริญเมื่อใช้ใบกวนแบบ propeller ร่วมกับ draft tube ทำให้การเกิด wall growth ลดลงอย่างมาก เมื่อเทียบกับการใช้ใบกวน flat blade อย่างเดียว อีกทั้ง pellet ที่ได้ก็มีลักษณะเป็นรูปแท่งปริมาณมากขึ้น แสดงว่าการใช้ใบกวนที่ทำให้ลักษณะการไหลของของเหลวเป็นแบบ axial flow ให้การผสมผสานทั่วทั้งถังหมักดีกว่าการใช้ใบกวนแบบ flat blade ทั้งในด้านการเกิด wall growth ก็ลดลงด้วย (ดังแสดงในตารางที่ 1) ทำให้เชื้อได้มีโอกาสคลุกเคล้าอาหารได้สม่ำเสมอ การสร้างสีจึงดีขึ้นด้วย

สรุป

เชื้อรา *Monascus* sp. 20M10.2 สามารถสร้างสีเหลืองโดยอาศัยกลไกที่ต่างไปจากเชื้อรา *Monascus* สายพันธุ์อื่นๆ ที่มีผู้ค้นพบก่อนหน้านี้ ทำให้สร้างสีเหลืองได้ดีที่พีเอชอาหารเริ่มต้น 7.0 โดยสามารถใช้อาหารอย่างมีประสิทธิภาพสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ซึ่งเจริญใน optimized medium เช่นกัน แต่สายพันธุ์พ่อแม่ใช้อาหารมีความเข้มข้นต่ำกว่า (แป้งมันสำปะหลังและแป้งถั่วเหลือง 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์) ขณะที่สายพันธุ์ 20M10.2 ใช้แป้งมันสำปะหลังและแป้ง

ถั่วเหลือง 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ การใช้ต้นเชื้อสำหรับการเจริญซึ่งแต่เดิมวรรณภา (2529) และสุภาพร (2531) ได้ใช้ข้าวแดงเป็นต้นเชื้อสำหรับการเจริญในถังหมัก พบว่าใช้เวลาในการเตรียมต้นเชื้อ นานกว่า 2 สัปดาห์ และมีปัญหาสำหรับการเตรียมปริมาณมาก แต่การทดลองนี้สามารถใช้ต้นเชื้อจากเชื้อราเจริญในอาหารเหลวอายุเพียง 2 วัน ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ แทนได้ ซึ่งสามารถเตรียมได้สะดวก และเร็วกว่า ส่วนการเลี้ยงเชื้อแบบป้อนอาหารเมื่อใช้ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 2/3 ของปริมาตรทั้งหมด แล้วเติมอาหารอีก 1/3 เมื่อการเจริญมีอายุ 2 วัน พบว่าการสร้างสียืดยาวออกไปถึงวันที่ 9 แต่ได้สีสูงสุดถึง 959 หน่วยต่อมิลลิลิตร เพิ่มขึ้นกว่าการเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จถึง 44 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นจุดที่น่าสนใจ เนื่องจากการใช้อาหารมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นมาก จึงน่าศึกษากลไกการเลี้ยงเชื้อแบบป้อนอาหารมีผล ต่อปัจจัยใดบ้างในการสร้างสีต่อไป การเจริญในถังหมักเมื่อใช้ใบกวนแบบ propeller ร่วมกับ draft tube ทำให้ลดปัญหาการเกิด wall growth ได้มากอีก ทั้งเป็นการประหยัดพลังงานเพราะใบกวนแบบ propeller ใช้พลังงานน้อยกว่าใบกวนแบบ flat blade ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์

คำขอบคุณ

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของทุนวิจัยและพัฒนาการปรับปรุงคุณภาพและปริมาณการผลิตสีผสมอาหารจากการหมักมันสำปะหลังจากศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (พ.ศ. 2531-34)

เอกสารอ้างอิง

บุษบา ยงสมิทธ์ และ วรรณภา ทาบโลกา. 2527. การใช้แป้งมันสำปะหลังในการผลิตสีผสมอาหารและเอนไซม์ย่อยแป้งโดยราโมแนสคัสในสภาพหมักเปียก. งานประชุมวิชาการเกษตรครั้งที่ 22, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 451-452.

บุษบา ยงสมิทธ์. 2531. การผลิตสีผสมอาหารจากมันสำปะหลังเพื่ออุตสาหกรรมหมัก. รายงานการวิจัย. เสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ. 225 น.

วรรณภา ทาบโลกา. 2529. ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตสีของโมแนสคัสที่เจริญบนอาหารแป้งมันสำปะหลังในสภาพหมักเปียก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุภาพร จันทร์ศิริโพธา. 2531. การปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อราแดง เพื่อเพิ่มความสามารถการผลิตสีโดยวิธีการกลายพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Byrne, G.S. and O.P. Ward. 1989. Growth of *Rhizopus arrhizus.* in fermentation media. J. Ind. Microbiolo. 4 : 155-161.

Carels, M. and D. Shepherd. 1977. The effect of different nitrogen Source on pigment production and sporulation on Monascus sp. in Submerged skaken culture. Can. J. Microbiol. 23 ; 1360-1372.

Carels, M. and D. Shepherd. 1978. The Effect of pH and Amino Acids on Conidiation and Pigment Production of *Monascus* major ATCC 16362 and *Monascus rubiginosus* ATCC 16367 in Submerged Shaken Culture. Can. J. Microbiol. 24 : 1346-1357.

Dubois, M. 1956. Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28 : 350-356.

Huang, T.L. 1981. Fermentative production and toxic test of natural pigment-Monascus pigment (in Chinese). Master Thesis, National Taiwan University, Taipai. *cite* by T.F. Lin and A.L. Demain. 1991. Effect of nutrition of *Monascus* sp. on formation of red pigments. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36 : 70-75

Iizuka, H. and S. Mineki. 1977. Studies on the Genus Monascus I. Purification and Properties of Two Forms of Glucoamylase From *Monascus* kaoliang NOV. SP. F.1 J. Gen. Appl. Microbiol. 23 : 217-230.

John, M.R. and D.M. Stuart. 1991. Production of Pigments by *Monascus purpureus.* in solid culture. J. Ind. Microbiol. 8 : 23-28.

Lin, C.F. 1973. Isolation and Cultural Conditions of *Monascus* sp. for the Production of Pigment in a Submerged Culture. J. Ferment. Technol. 51(6) : 407-414.

Mchan, F. and G.T. Johnson. 1970. Zinc and amino acid : Important component of medium promoting growth of *Monascus purpureus.* Mycologia. 62 ; 1018-1031.

Shepherd, D 1977. The relationships between pigment production and sporulation in *Monascus* sp., pp. 103-188. In J. Meyrath and J.D. Bu'Lock (eds.). Biotechnology and Fungal Differentiation FEMS Symposium No.4. Academic Press, Inc., New York.

Shepherd, D. and M. Carels. 1983. Product formation and differentiation in fungi, pp. 315-535. *In* J.E. Smith (ed.). Fungal Differentiation. Mereel Dekker, Inc,. New York.

Su, Y.C. 1978. The productionof *Monascus* pigments (in Chinese). Food Sci. 5 : 4A-17A. Cited by T.F. Lin and A.L. Demain. 1991. Effect of nutrition of *Monascus* sp. on formation of red pigments. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36 : 7

Suijdam, J.C.V. and B. Metz. 1981. Influence of Engineering Variables upon the morphology of filamentous moulds. Biotechnol. Bioeng. 23 : 111-148.

Sweeny, J.G., M.C. Estrada-Valdes, G.A. Iacobucci, H. Sato and S. Sakamura. 1981. Photoprotection of the Red Pigments of *Monascus anka* in Aqueous Media by 1,4,6-trihydroxynaphthalene. J. Agric. Food. Chem. 29 : 1189-1193.

Wong, H.C. 1982. Antibiotic and Pigment Production by *Monascus purpureus.* Ph.D. Thesis, University of Georgia, Athens. *Cited by* T.F. Lin and A.L. Demain. 1991. Effect of Nutrition of *Monascus* sp. on Formation of Red Pigment. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36 : 70-75.

Yongsmith, B., L. Chitradon, S. Krairak, W. Tabloka and R. Bavavoda. 1990. Cassava Fermentation of Yellow Pigments and Amylolytic Enzymes of a Mutant of *Monascus* spp. in Submerge Cultivation. Microbial Utilization of Renewable Resources, 7 : 354-363.

Yongsmith, B., W. Tabloka, W, Yongmanitchai and R. Bavavoda. 1992. Culture conditions for yellow pigment formation by Monacus sp. KB 10 grown on cassava medium. World J. Microbiol. Biotechnol., 9(2) : in press.

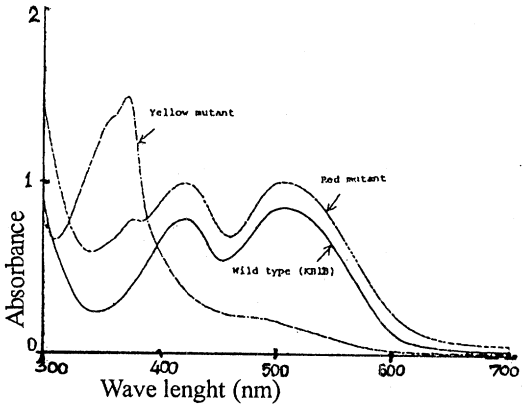

Figure 1 Comparision maximum adsorbtion of pigment between wild type, red mutant and yellow mutant

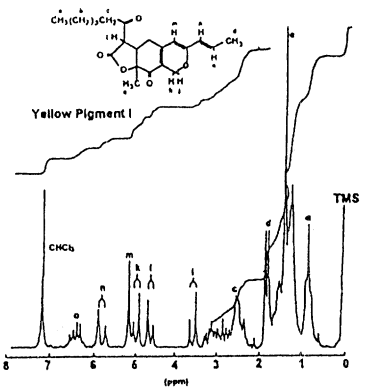

Figure 2 The structure of monascin which derived from *Monascus* sp. 20 M 10.2

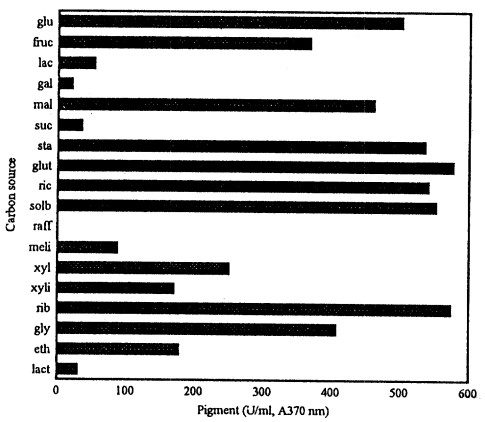

Figure 3 Effect of various carbon source on pigment production of Monacus sp. 20 M 10.2 The culture was carried on 75 ml of optimized medium in 250-ml flask which initial pH was adjusted to 7.0, shaking speed was 300 rpm at 28 C.

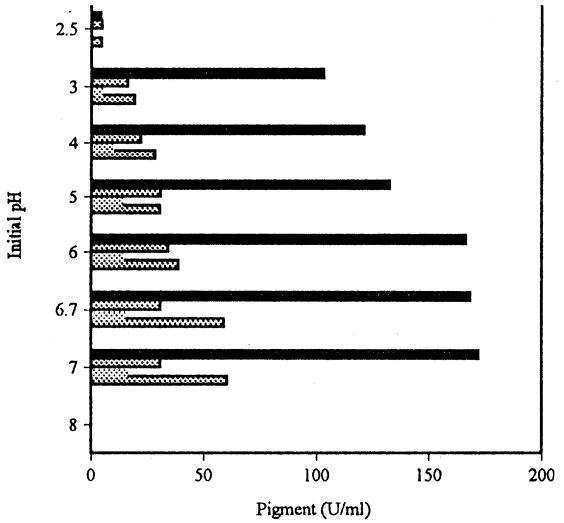

Figure 4 Effect of composition of complete medium on yellow pigment production by *Monascus* sp. 20 M 10.2

■CM ▒CM-y
▒CM-m ▒CM-p

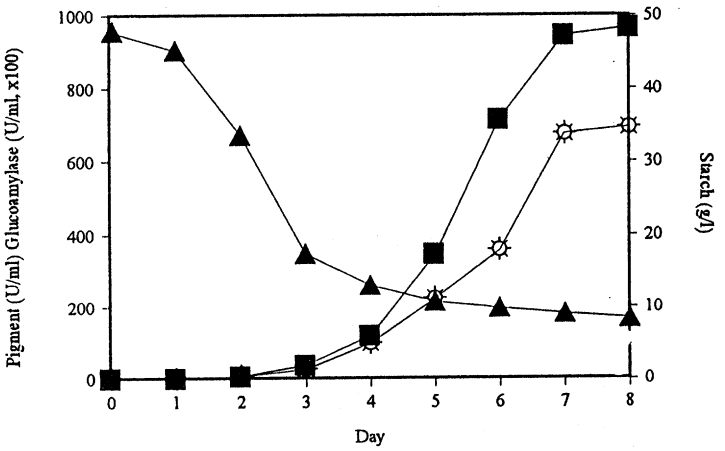

Figure 5 Fermentation time-course of *Monascus* sp. 20 M 10.2 in optimum condition, 3% cassava starch, 5% soy bean flour, initial pH and volume were 7.0 and 75 ml, respectively. The cultivation was carried on 300 rpm rotatory shaker at 28 C.

-☼- Pigment
-■- Glucoamylase
-▲- Starch

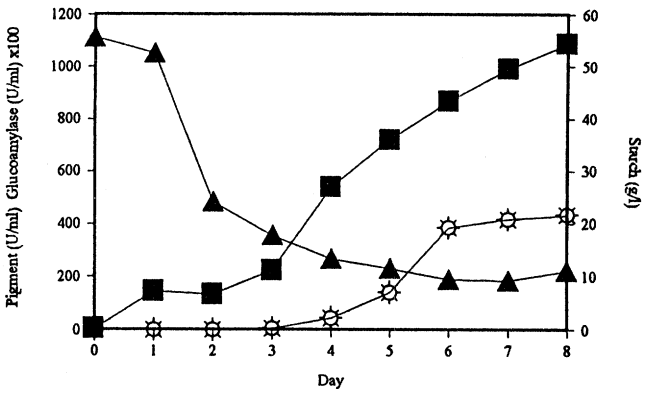

Figure 6 Fermentation time-course of *Monascus* sp. 20 M 10.2 when using the whole koji as the inoculum. The cultivation was carried on optimum condition in shaking flask.

Pigment
Glucoamylase
Starch

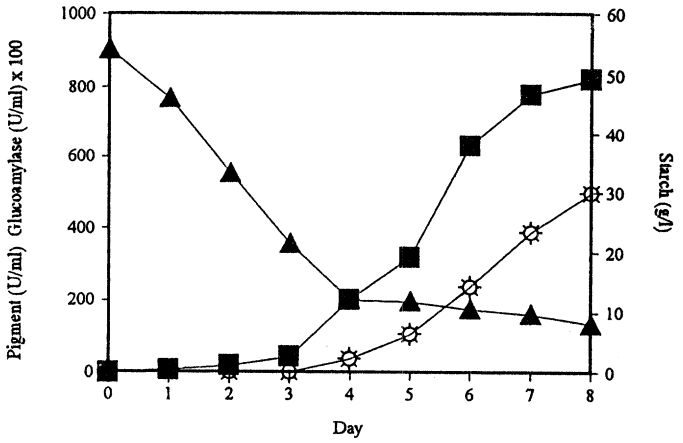

Figure 7 Fermentation time-course of *Monascus* sp. 20 M 10.2 when using koji spore as inoculum. The cultivation was carried on optimum condition in shaking flask.

Pigment Glucoamylase Starch

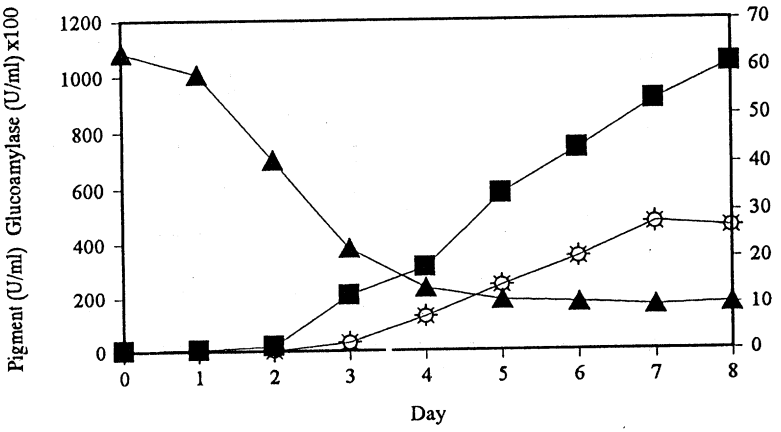

Figure 8 Fermentation time-course of *Monascus* sp. 20 M 10.2 when using submerge culture as inoculum. The cultivation was carried on optimum condition in shaking flask.

Pigment
Glucoamylase
Starch

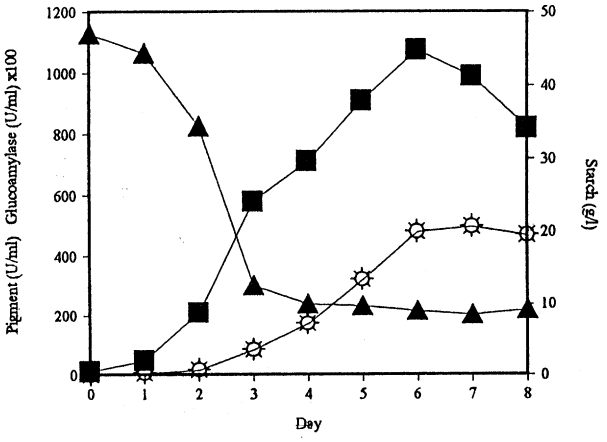

Figure 9 Fermentation time-course of *Monascus* sp. 20 M 10.2 when using centrifuged submerg culture as inoculum. The cultivation was carried on optimum condition in shaking flask.

Pigment
Glucoamylase
Starch

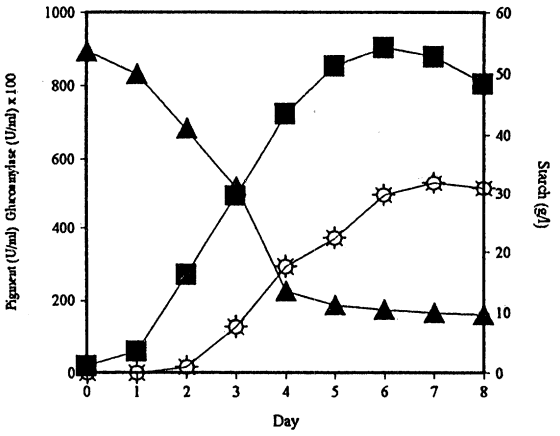

Figure 10 Fermentation time-course of *Monascus* sp. 20 M 10.2 when using homogenized -submerge culture as inoculum. The cultivation was carried on optimum condition in shaking flask.

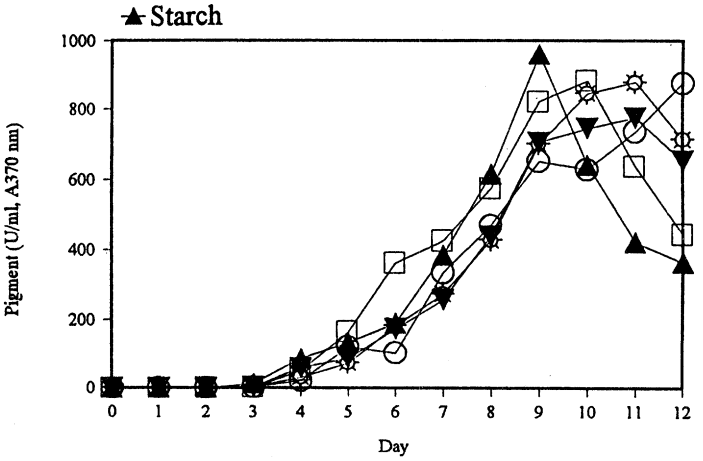

Figure 11 Fermentation time-course of *Monascus* sp. 20 M 10.2 in fed-batch cultivation. Initial volume was 50 ml. and then adding the 25 ml. of fresh medium at various day. The culture was carried on 300 rpm shaking flask, at 28 C.

add 1 day add 2 day
add 3 day add 4 day
add 5 day

Table 1. Effect of impeller blade type with or without draft tube on yellow pigmentation.

Impeller type	Draft tube	Wall growth	Pellet	Pigmentation
Propeller	+	+	needle form	+ + + + +
Flat blade	+	+ +	spherical form	+ + +
Propeller	−	+ +	thread like form	+
Flat blade	−	+ + + + +	spherical form	+ +